



## اثر اسیدآسکوربیک بر بیان ژنهای Bax و Bcl-2 و تکوین فولیکولهای پره آنترال جدا شده از تخمدانهای انجمادی و غیرانجمادی در محیط کشت

طاهره مازوچی<sup>۱\*</sup>، طاهره خامه‌چیان<sup>۱</sup>، سید غلامعباس موسوی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

<sup>۲</sup> گروه آمار و بهداشت عمومی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی کاشان

### چکیده

زمینه: این مطالعه جهت ارزیابی اثر اسیدآسکوربیک بر بیان ژنهای Bax و Bcl-2 و تکوین فولیکولهای پره آنترال جدا شده از تخمدان انجماد شیشه‌ای و غیر انجمادی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق یکی از دو تخمدان ۴۰ موش سوری ماده به روش انجماد شیشه‌ای منجمد شد. فولیکولهای پره آنترال به روش مکانیکی از تخمدانهای انجمادی و غیرانجمادی جدا و به مدت ۱۰ روز در محیط  $\alpha$ -MEM و در ۴ گروه کشت، شامل غیرانجمادی و محیط کشت فاقد اسیدآسکوربیک (NVNA)، غیرانجمادی و حاوی اسیدآسکوربیک (NVA)، انجمادی و فاقد اسیدآسکوربیک (VNA) و انجمادی و حاوی اسیدآسکوربیک (VA)، از نظر بیان ژنهای Bax و Bcl-2، میزان بقا، قطر فولیکولها و تشکیل حفره آنتروم مقایسه شدند. یافته‌ها: قطر فولیکولها در روز دوم در گروه‌های NVNA، NVA، VNA و VA به ترتیب  $213/1 \pm 11/8$ ،  $218/8 \pm 8/5$ ،  $202/9 \pm 6/2$  و  $215/9 \pm 9/2$  میکرومتر بود. قطر فولیکولها در روز دوم و چهارم در گروه NVNA و NVA به طور معنی‌داری بیشتر از گروه VNA بود (به ترتیب  $p=0/011$  و  $p=0/001$ ). در گروه انجمادی اسیدآسکوربیک قطر فولیکولی را در روز چهارم کشت افزایش داد ( $p=0/001$ ). بیان نیمه کمی ژن Bax در گروه NVA نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری کمتر بود ( $p=0/001$ ).

نتیجه‌گیری: اسیدآسکوربیک در گروه غیرانجمادی تأثیری بر روی رشد، بقا و تشکیل حفره آنتروم در شرایط *in vitro* نداشت. اما سبب کاهش بیان ژن Bax در گروه غیرانجمادی و بهبود رشد فولیکولها پس از انجماد شیشه‌ای تخمدان شد.

واژگان کلیدی: اسیدآسکوربیک، انجماد شیشه‌ای، فولیکولهای پره آنترال، ژن Bax، ژن Bcl-2

دریافت مقاله: ۸۸/۸/۲ - پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۲۱

\*مرکز تحقیقات علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران، کدپستی: ۸۷۱۵۹-۸۸۱۴۱

## مقدمه

کشت فولیکول‌های جداشده از تخمدان روش مفیدی است که برای مطالعه فرآیند تکوین فولیکول‌ها، اثرات سمی و تراژونیک ترکیبات و یا داروهای جدید بر روی رشد فولیکول استفاده می‌شود (۱). همچنین از کشت فولیکول‌های نابالغ برای بررسی اثرات انجماد بر تخمدان و در بالین برای بدست آوردن تخمک‌های بالغ بعد از انجماد تخمدان استفاده می‌شود. همراهی فن‌آوری انجماد بافت تخمدانی و بلوغ تخمک‌ها در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) می‌تواند روش مناسبی برای حفظ باروری در بیماران جوان مبتلا به سرطان باشد؛ قبل از اینکه رادیودرمانی یا شیمی‌درمانی، ذخیره تخمدانی آنها را تخریب نماید (۲-۴).

روش‌های کشت مختلفی به منظور رشد فولیکول‌ها، تولید اووسیت‌های کاملاً صلاحیت‌دار با قدرت باروری، پایه‌ریزی شده است. آنچه که در همه شیوه‌های کشت مشابه است، وجود منبع غذایی، الکترولیت‌ها، اسیدهای آمینه و سایر عوامل ضروری برای رشد فولیکول‌ها و دیگری حذف همه تولیدات زائد مانند آمونیاک است که ممکن است تجمع پیدا کرده و برای رشد فولیکول‌ها مضر باشد (۵). در شیوه‌های کشت مختلف مرحله رشد فولیکولی، روش جداسازی فولیکول‌ها، ترکیب محیط کشت و همچنین شرایط کشت فولیکول متفاوت می‌باشد.

در این نوع مطالعات انتخاب مرحله بلوغ فولیکول مهم می‌باشد. چراکه علی‌رغم اینکه تخمدان دارای مجموعه‌ای از فولیکول‌ها در مراحل مختلف رشد می‌باشد، انتخاب مرحله‌ای از رشد که بتواند در *in vitro* به‌خوبی تکوین یافته و بالغ شود حائز اهمیت می‌باشد. فولیکول‌های بدوی اگرچه بیش از

۹۰ درصد از جمعیت فولیکول‌ها را تشکیل می‌دهند، اما کشت آنها در *in vitro* با مشکل روبرو است. در صورتی که کشت فولیکول‌های پره‌آنترال با موفقیت انجام شده است (۶).

فولیکول‌هایی که به روش مکانیکی یا آنزیمی از تخمدان جدا شده‌اند، می‌توانند به روش کروی و یا غیرکروی کشت داده شوند. اگرچه در روش کشت غیرکروی فولیکول پس از رشد ساختار سه‌بعدی خود را از دست می‌دهد اما فولیکول‌های آنترال حاصل، عملکرد تمام اجزاء خود یعنی سلول‌های تکا، گرانولوزا و اووسیت را حفظ می‌کنند و تکامل فولیکول شبیه به شرایط محیط زنده (*in vivo*) است. در این روش لایه سلول‌های تکای اطراف غشا پایه که ممکن است سدی برای رسیدن اکسیژن و مواد غذایی موجود در محیط کشت به سلول‌های گرانولوزا باشد، فولیکول را به کف ظرف کشت می‌چسباند و سلول‌های گرانولوزا غشا پایه را پاره کرده از سلول‌های تکا بیرون می‌زنند و بدین ترتیب دسترسی تمام اجزا فولیکولی به مواد موجود در محیط کشت زیادتر می‌شود (۷). به‌علاوه در شیوه‌های کشت‌های مختلف، محیطی که استفاده می‌شود و همچنین مکمل‌هایی که به آن اضافه می‌شود متفاوت می‌باشد. فولیکول‌های تخمدانی موش عموماً در  $\alpha$ -MEM<sup>۱</sup> کشت داده می‌شوند که برای انواع سلول‌های با سرعت تقسیم زیاد مناسب است (۸).

در زمینه بهبود شرایط کشت فولیکول‌ها تحقیقاتی انجام شده است. کاهش غلظت رادیکال‌های آزاد در محیط کشت می‌تواند راهی برای بهبود ظرفیت تکوینی فولیکول‌ها و اووسیت‌های کشت شده در

<sup>۱</sup> alpha Modification of Minimal Essential Medium

*in vitro* و متعاقب آن داشتن جنین‌های با کیفیت بالا باشد. یکی از روش‌های مقابله با رادیکال‌های آزاد آنتی‌اکسیدان‌ها مانند اسیدآسکوربیک می‌باشد (۹-۱۱). بیشتر مطالعات به نقش اسیدآسکوربیک در تشکیل و پسروری جسم زرد پرداخته‌اند و مطالعات کمی در رابطه با عملکرد آن در رشد فولیکولی و میزان بقاء در طول کشت وجود دارد.

نتایج مطالعه‌ای نشان داد اضافه کردن اسیدآسکوربیک به محیط کشت فاقد سرم توانست به‌طور معنی‌داری سبب کاهش آپوپتوز شود اما در محیط حاوی سرم بر رشد فولیکولی و تولید استرادیول مؤثر نبود (۱۲). در مطالعه دیگری در محیط فاقد سرم درصد فولیکول‌های دست نخورده با اضافه کردن اسیدآسکوربیک بیشتر شد. در این روش کشت ارتباط منفی بین درصد رشد فولیکولی و فولیکول‌هایی که دست نخورده باقی می‌مانند وجود داشت (۱۳). اسیدآسکوربیک در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سبب کاهش آپوپتوز در فولیکول‌های بدوی جدا شده از تخمدان‌های تازه و انجمادی که به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت کشت شده بودند شد، اما این کاهش معنی‌دار نبود. همچنین این دوز اسیدآسکوربیک آپوپتوز را در سلول‌های استرومایی تخمدان‌های تازه و انجمادی اینکوبه شده به مدت ۲۴ ساعت کاهش داد اما بعد از ۴۸ ساعت این کاهش معنی‌دار نبود (۱۴). به‌نظر می‌رسد این دوز اسیدآسکوربیک برای کشت فولیکول‌های تخمدانی کافی نباشد.

درگیری چندین ژن پرو و آنتی‌آپوپتوزی مانند Bax و Bcl-2 در بقاء فولیکول‌های تخمدانی ثابت شده است (۱۷-۱۵). Bcl-2 یک پروتئین مهارکننده آپوپتوز است که در غشاء هسته و میتوکندری قرار

دارد. بیان آن در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی مشاهده شده است (۱۵ و ۱۶). Bax پروتئین القاء‌کننده آپوپتوز است که مانع تمامیت میتوکندری شده و سبب تورم و پاره شدن غشاء خارجی آن و آزاد شدن سیتوکروم C از غشاء داخلی میتوکندری به سیتوزول می‌شود. Bax عمدتاً عمل پروآپوپتوزی خود را از طریق دایمر شدن با Bcl-2 اعمال می‌کند (۱۷). هدف از این مطالعه ارزیابی اثر غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسیدآسکوربیک بر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 و تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال جداشده از تخمدان انجماد شیشه‌ای و غیرانجمادی در محیط کشت بود.

## مواد و روش کار

### تهیه بافت تخمدان انجمادی و غیرانجمادی

تحقیق به روش تجربی بر روی ۳۰ سر موش سوری ماده با سن تقریبی ۴-۶ هفته نژاد NMRI انجام گرفت. موش‌ها به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند. تخمدان‌ها به‌طور تصادفی در دو گروه انجمادی (V) و غیرانجمادی (NV) قرار گرفتند. در گروه انجمادی از روش انجماد شیشه‌ای استفاده شد (۱۸). به‌طور خلاصه تخمدان‌ها پس از برداشتن بافت‌های اطراف در محلول انجمادی حاوی ۴۰ درصد اتیلن‌گلیکول، ۳۰ درصد فایکول ۷۰ و نیم مول ساکاروز (EGFS40) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس به مدت یک هفته در نیتروژن مایع ذخیره و ذوب سریع انجام شد. جهت ذوب از غلظت‌های نزولی ساکاروز استفاده شد.

### جداسازی فولیکول‌ها

از تخمدان‌های گروه انجمادی و غیرانجمادی به روش مکانیکی و با استفاده از نوک سوزن ۲۹G سرنگ انسولین

شده در محیط حاوی اسیدآسکوربیک (NVA)، فولیکول‌های جدا شده از تخمدان غیرانجمادی و کشت فاقد اسیدآسکوربیک (NVNA) بودند.

### ارزیابی رشد و بقای فولیکول‌ها در طول کشت

از آنجا که در این مطالعه فولیکول‌ها به روش غیرکروی کشت داده شدند، تنها تا روز چهارم کشت امکان ارزیابی قطر فولیکول‌ها وجود داشت. بدین ترتیب قطر کامل فولیکول‌ها در روزهای ۲ و ۴ کشت با استفاده از میکرومتر مدرج میکروسکوپ معکوس (Olympus, Japon) و با تعیین میانگین دو قطر عمودی محاسبه شد. میزان بقای فولیکول‌ها در میانه و انتهای کشت یعنی روزهای ۵ و ۱۰ کشت در چهار گروه بررسی شد. از دست دادن اووسیت، تیره رنگ شدن فولیکول و توقف رشد به عنوان فولیکول غیر زنده در نظر گرفته شد. همچنین در پایان دوره کشت تشکیل حفره آنتروم زیر میکروسکوپ ارزیابی شد.

**بررسی بیان Bax و Bcl-2 به روش RT-PCR نیمه کمی**  
بیان ژن آنتی آپوپتوزی Bcl-2 و پروآپوپتوزی Bax در میانه کشت یعنی روز پنجم در فولیکول‌های چهار گروه (VA، VNA، NVA و NVNA) به روش RT-PCR نیمه کمی<sup>۲</sup> انجام شد. ابتدا استخراج RNA با استفاده از کیت RNeasy Minikit (Qiagen, USA Cat. No.74104) و مطابق با دستورالعمل آن انجام شد. RNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی با دو روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. پس از اطمینان از خلوص RNA، ساخت cDNA از روی آن به وسیله کیت (Fermentas, Lot: 00014995) و بر اساس دستورالعمل آن انجام گرفت. cDNA حاصل روی یخ

زیر بزرگنمایی ۲۵ استریومیکروسکوپ (Olympus, Japon)، فولیکول‌های پره‌آنترال با قطر ۱۴۰-۱۲۰ میکرون جدا شدند. فولیکول‌هایی انتخاب شدند که دارای تخمک مرکزی با ۳-۲ لایه سلول گرانولوزا در اطراف بودند. در محیط این فولیکول‌ها سلول‌های تکا و غشا پایه سلول‌های گرانولوزا قرار داشتند.

### کشت فولیکول‌ها

جهت کشت فولیکول‌ها از محیط کشت  $\alpha$ -MEM (Gibco, UK) حاوی ۵ درصد FBS، ۱۰۰ میلی واحد بین‌المللی در میلی لیتر rFSH (Serono, Switzerland)، ITS یک درصد (Gibco, UK)، ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر mrEGF (Sigma, Germany)، ۱۰۰ میلی واحد بین‌المللی در میلی لیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین استفاده شد. هر فولیکول به طور جداگانه در قطره‌های ۲۰ میکرولیتری از محیط کشت به مدت ۱۰ روز زیر روغن، در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دی اکسید کربن ۵ درصد و رطوبت کشت داده شد. نیمی از محیط کشت یک روز در میان با محیط کشت تازه تعویض می شد. جهت بررسی اثر اسیدآسکوربیک بر روی رشد و بلوغ فولیکول‌ها، به طور تصادفی تعدادی از فولیکول‌های جدا شده از هر گروه V و NV در محیط کشتی که ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اسیدآسکوربیک (Sigma, A4544) اضافه شده بود، کشت داده شدند.

### گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه شامل فولیکول‌های جدا شده از تخمدان انجمادی و کشت شده در محیط حاوی اسیدآسکوربیک (VA)، فولیکول‌های جدا شده از تخمدان انجمادی و کشت فاقد اسیدآسکوربیک (VNA)، فولیکول‌های جدا شده از تخمدان غیرانجمادی و کشت

<sup>2</sup> Semi- quantitative Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction

کروسکال والیس<sup>۵</sup> و سپس من-ویتنی<sup>۶</sup> و کای دو تجزیه و تحلیل شد. P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد. جهت مقایسه نیمه کمی بیان ژن های Bax و Bcl-2 پس از اسکن ژل ها، شدت هر باند با استفاده از نرم افزار Uvitec (Total Lab, UK) نسخه ۱۰ محاسبه گردید. واکنش RT-PCR با شرایط یکسان حداقل ۳ بار تکرار شد. در نهایت مقدار نسبی بیان هر ژن، به وسیله محاسبه میانگین نسبت شدت باند مربوط به آن به شدت باند  $\beta 2m$  مربوطه تعیین شد و نتایج با استفاده از آزمون Post-hoc LSD تحت تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

### یافته ها

#### شکل شناسی فولیکول ها در روزهای کشت

فولیکول های جدا شده در مرحله پره آنترال حاوی اووسیت در مرحله وزیکول زاینده<sup>۷</sup> بودند که به وسیله ۲-۳ لایه سلول های گرانولوزا درون غشای پایه احاطه شده بودند. اطراف فولیکول به وسیله سلول های تکای پهن پوشیده شده بود. در روز دوم کشت، فولیکول ها در اثر جدا شدن سلول های تکا و چسبیدن این سلول ها به کف ظرف کشت بی حرکت شدند. سلول های گرانولوزا پس از تکثیر و پاره کردن غشای پایه گرانولوزا، به سمت اطراف فولیکول گسترش پیدا کرده و از روز چهارم به بعد فولیکول شکل نامنظمی نشان داد به طوری که باعث شد تغییرات قطر تنها تا روز چهارم کشت قابل بررسی باشد. از روز هشتم به بعد در تعدادی از فولیکول ها حفراتی در اطراف تخمک پدید آمد که همانند حفرات آنتروم در فولیکول های *in vivo* بود (شکل ۱).

قرار داده شد و تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. در این پژوهش جهت انجام واکنش PCR از کیت (Taq Roche Germany; Cat. No. DNA Polymerase 1 596 594) استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده ژن Bax و Bcl-2 و اندازه و شماره دست یابی آنها در Genbank به این ترتیب است:

- [F:5'CGGCGAATTGGAGATGAACTG 3', R5'GCAAAGTAGAAGAGGGCAAC C 3' (NM 007527: 160bp)]
- [F:5' ACCGTCGTGACTTCGCAGAG 3' R5'GGTGTGCAGATGCCGGTTCA 3' (NM 00177410: 240bp)]

همچنین از ژن بتا- دومیکروگلوبولین ( $\beta 2m$ )<sup>۳</sup> به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. شرایط PCR به این صورت بود که دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، Annealing در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، امتداد رشته دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۵۰ ثانیه و امتداد نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصول به دست آمده با ژل آگاروز ۱/۵ درصد انجام شد. جهت مشخص نمودن محل باندهای ظاهر شده بر روی ژل از ladder ( ) 100bp, Fermentas, Lot: 00014815 استفاده شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده با استفاده از نسخه ۱۳ نرم افزار SPSS (Inc, Chicago, IL SPSS) و با استفاده از آزمون های کولموگوروف-اسمیرنوف<sup>۴</sup>، تحلیل واریانس یک سویه و سپس آزمون Tukey،

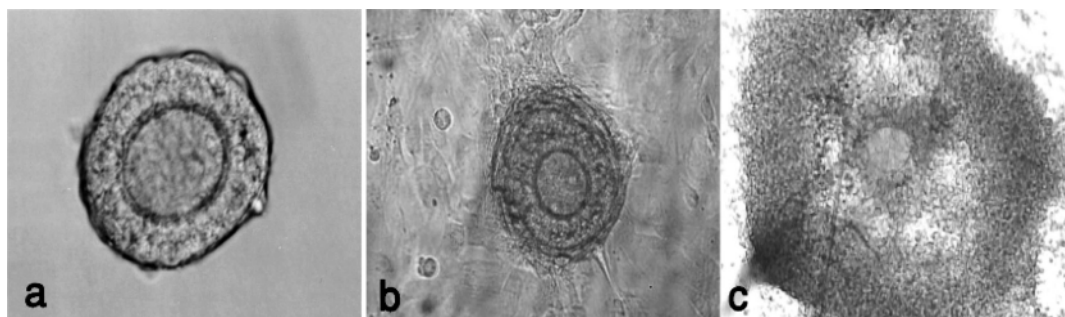
<sup>5</sup> Kruskal Wallis

<sup>6</sup> Mann-Whitney

<sup>7</sup> Germinal Vesicle

<sup>3</sup> Beta-2 Microglobulin

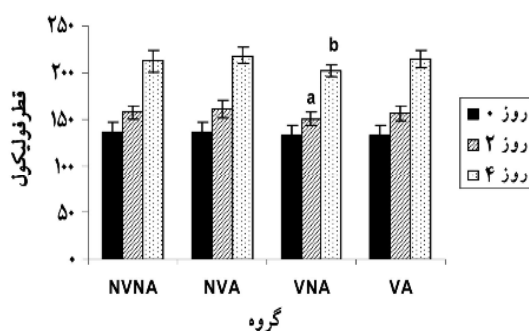
<sup>4</sup> Kolmogorv-Smirnov Test



شکل ۱) کشت فولیکول‌های جدا شده از تخمدان انجماد شیشه‌ای و ذوب شده

a: فولیکول پره‌آنترال جدا شده به روش مکانیکی از تخمدان انجماد شیشه‌ای شده (بزرگنمایی  $\times 200$ ). b: روز دوم کشت در گروه VA، سلول‌های تکا لایه‌ای را در زیر فولیکول ایجاد می‌کنند و فولیکول را به کف می‌چسباند (بزرگنمایی  $\times 100$ ). c: روز دهم کشت در گروه VA، حفراتی در اطراف تخمک پدید می‌آید که همانند حفرات آنتروم در شرایط *in vivo* است (بزرگنمایی  $\times 100$ ).

اسیدآسکوربیک (NVA) و چه در غیاب آن (NVNA) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه انجمادی بدون اسیدآسکوربیک بود (به‌ترتیب  $p=0/01$  و  $p=0/001$ ).



نمودار ۱) میانگین قطر فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان انجمادی و غیرانجمادی در محیط کشت حاوی اسید آسکوربیک و فاقد آن

a: اختلاف معنی‌دار با گروه NVNA ( $p=0/01$ ) و NVA ( $p=0/001$ ) در همان روز

b: اختلاف معنی‌دار با بقیه گروه‌ها در همان روز ( $p=0/001$ )

در روز چهارم کشت هم تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های غیرانجمادی با گروه انجمادی بدون اسیدآسکوربیک مشاهده شد ( $p=0/001$ ). در هر دو گروه انجمادی و غیرانجمادی مقایسه قطر روز دوم در محیط کشت با و بدون اسیدآسکوربیک نشان می‌دهد که اگرچه قطر فولیکولی در محیط کشت حاوی اسیدآسکوربیک بیشتر از فاقد

### قطر فولیکول‌ها در طول کشت

قطر فولیکول‌ها در همه گروه‌ها در روز صفر، دوم و چهارم کشت اندازه‌گیری و مقایسه شد. از آنجایی که فولیکول‌ها از روز چهارم به بعد شکل کروی خود را از دست دادند و ظاهری منتشر نشان دادند، اندازه‌گیری قطر از این روز به بعد امکان‌پذیر نبود. نتایج تغییرات قطر در نمودار ۱ آمده است. چنانکه نتایج نشان می‌دهد قطر فولیکول‌ها در همه گروه‌ها در طول روزهای کشت افزایش پیدا کرد. میانگین قطر فولیکول‌ها در روز صفر در گروه غیرانجمادی  $133/2 \pm 11/3$  و در گروه انجمادی  $136/9 \pm 11/5$  میکرومتر بود که تفاوت معنی‌داری نداشت. قطر فولیکول‌ها در روز دوم در گروه‌های NVNA، NVA، VNA و VA به‌ترتیب  $158/5 \pm 7/2$ ،  $161/9 \pm 9/6$ ،  $151/7 \pm 6/4$  و  $157/6 \pm 7/6$  میکرومتر و در روز چهارم به‌ترتیب  $213/1$ ،  $218/8 \pm 8/5$ ،  $202/9 \pm 6/2$  و  $215/9 \pm 9/2$  میکرومتر بود. مقایسه گروه‌های انجمادی با غیرانجمادی نشان می‌دهد که قطر فولیکول‌ها در روز دوم کشت در گروه غیرانجمادی چه در حضور

پنجم و دهم کشت اختلاف معنی‌داری را در گروه‌های مختلف نشان نداد.

#### تشکیل حفره آنتروم

در همه گروه‌ها از روز هشتم کشت به بعد بین سلول‌های گرانولوزا حفراتی دیده شد که شبیه حفره آنتروم بود. درصد تشکیل حفره آنتروم در فولیکول‌های زنده در چهار گروه در روز دهم کشت یعنی پایان دوره کشت مقایسه شد. در گروه NVNA از ۵۲ فولیکول زنده در روز دهم کشت ۱۶ فولیکول معادل ۳۰/۸ درصد، در گروه NVA از ۶۸ فولیکول زنده ۲۱ فولیکول معادل ۳۰/۹ درصد، در گروه VNA از ۴۲ فولیکول زنده ۱۰ فولیکول معادل ۲۳/۸ درصد و در گروه VA از ۴۴ فولیکول زنده ۱۱ فولیکول معادل ۲۵/۰ درصد حفره شبه آنترال تشکیل دادند. اختلاف بین گروه‌ها از نظر تشکیل حفره آنترال از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول ۱).

اسیدآسکوربیک بود اما تفاوت معنی‌داری بین NVNA با NVA و VNA با VA مشاهده نشد. در صورتی‌که در روز چهارم کشت قطر فولیکول‌ها در گروه انجمادی با اسیدآسکوربیک بیشتر از گروه انجمادی و بدون اسیدآسکوربیک بود ( $p=0/001$ ).

#### میزان بقا فولیکول‌ها در طول کشت

میزان بقا فولیکول‌های کشت شده در چهار گروه در روزهای پنجم و دهم کشت زیر میکروسکوپ معکوس بر اساس شکل‌شناسی فولیکول‌ها تعیین و مقایسه شد. آزاد شدن خودبخودی تخمک از فولیکول و یا تیره شدن فولیکول به‌عنوان فولیکول غیر زنده تلقی شد. در روز پنجم کشت میزان بقا فولیکول‌های کشت شده در گروه‌های NVNA، NVA، VNA و VA به‌ترتیب ۹۱/۷، ۹۳/۴، ۸۳/۰ و ۹۰/۴ درصد و در روز دهم کشت به‌ترتیب ۸۶/۷، ۸۹/۵، ۷۹/۲ و ۸۴/۶ درصد بود (جدول ۱). مقایسه درصد میزان بقا در روزهای

جدول ۱) تکوین فولیکول‌های پره‌آنترال جداشده از تخمدان انجمادی و غیرانجمادی در محیط کشت حاوی اسیدآسکوربیک و فاقد آن

گروه‌ها	تعداد فولیکول	فولیکول زنده*		فولیکول با حفره آنتروم**
		روز ۵ کشت	روز ۱۰ کشت	
NVNA	۶۰	۵۵ (۹۱/۷)	۵۲ (۸۶/۷)	۱۶ (۳۰/۸)
NVA	۷۶	۷۱ (۹۳/۴)	۶۸ (۸۹/۵)	۲۱ (۳۰/۹)
VNA	۵۳	۴۴ (۸۳/۰)	۴۲ (۷۹/۲)	۱۰ (۲۳/۸)
VA	۵۲	۴۷ (۹۰/۴)	۴۴ (۸۴/۶)	۱۱ (۲۵/۰)

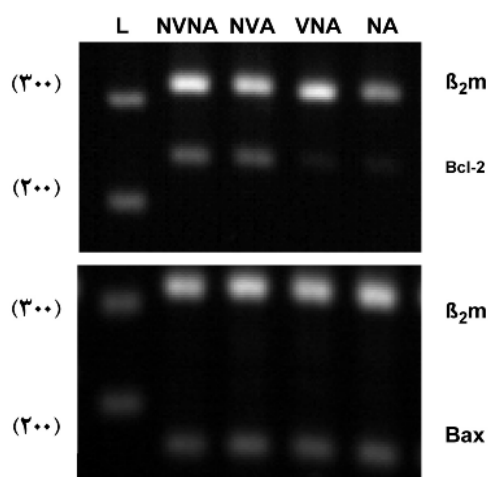
\*تعداد (%)

\*\*تعداد (درصد نسبت به فولیکول‌های زنده در روز ۱۰ کشت)

گروه‌های مورد بررسی می‌باشد (شکل ۲). سطح بیان این دو ژن نسبت به  $\beta 2m$  که در واقع نشان‌دهنده بیان نیمه-کمی آنها در گروه‌های مختلف مورد مطالعه می‌باشد، در نمودار ۲ نشان داده شده است. چنانکه مشاهده می‌شود حداکثر میزان بیان ژن Bax در فولیکول‌های گروه VNA و حداقل آن در NVA می‌باشد. تجزیه و تحلیل آماری

#### بیان نیمه‌کمی رونوشت Bax و Bcl-2 در گروه‌های مورد بررسی

در این مطالعه بیان نیمه‌کمی ژن‌های وابسته به آپوپتوز Bax و Bcl-2 در فولیکول‌های چهار گروه در روز پنجم کشت ارزیابی و مقایسه شد. مشاهده باندهای ۱۶۰ و ۲۴۰ bp روی ژل نشان‌دهنده بیان این دو ژن در همه



شکل ۲) بیان نیمه کمی Bcl-2 و Bax در گروه‌های مختلف مورد مطالعه  
L نشان‌دهنده Ladder. NVNA نشان‌دهنده گروه غیرانجمادی و بدون اسیدآسکوربیک، NVA نشان‌دهنده گروه غیرانجمادی و با آسکوربیک، VNA نشان‌دهنده گروه انجمادی و بدون آسکوربیک، NA نشان‌دهنده گروه انجمادی و با آسکوربیک می‌باشد.

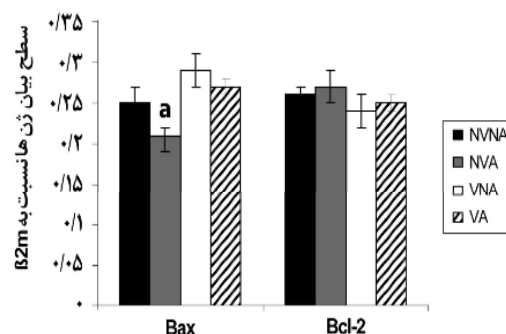
### بحث

این مطالعه نشان داد که فولیکول‌های پره‌آنترال جدا شده از تخمدان انجماد شیشه‌ای و غیرانجمادی می‌توانند در محیط کشت  $\alpha$ -MEM حاوی اسیدآسکوربیک با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بخوبی رشد کرده و تشکیل حفره آنترال دهند. نتایج تحقیق حاضر افزایش قطر فولیکول‌ها را در همه گروه‌ها در طول دوره کشت نشان داد. به‌رحال مقایسه گروه‌های انجمادی با غیرانجمادی در روز دوم و چهارم کشت نشان می‌دهد قطر فولیکول‌ها در هر دو گروه غیرانجمادی یعنی با و بدون اسیدآسکوربیک به طور معنی‌داری بیشتر از گروه انجمادی و بدون اسیدآسکوربیک است.

این نتایج نشان‌دهنده این است که در طول انجماد شیشه‌ای و ذوب تخمدان تغییراتی انجام می‌شود که سبب تأخیر در رشد و تکثیر سلول‌های فولیکولی می‌شود. فرایند انجماد می‌تواند سبب بروز

بیان نسبی Bax در گروه‌های مختلف مشخص کرد که تفاوت مشاهده شده بین گروه NVA با سایر گروه‌ها معنی‌دار ( $p=0/001$ ) بود.

با مقایسه شدت باند Bcl-2 به  $\beta 2m$  در گروه‌های مختلف مشخص شد که حداکثر میزان بیان این ژن در فولیکول‌های گروه AVN و حداقل آن در VNA مشاهده می‌شود. تجزیه و تحلیل آماری بیان نسبی Bcl-2 در گروه‌های مختلف، مشخص کرد که شدت بیان Bcl-2 در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت. از آنجا که نسبت بین پروتئین‌های سرکوب‌گر و آغازگر آپوپتوز در فعال کردن مسیرهای آپوپتوز اهمیت دارند، نسبت بیان نیمه کمی Bax به عنوان آغازگر آپوپتوز به بیان نیمه کمی Bcl-2 به عنوان سرکوب‌گر آپوپتوز محاسبه و در گروه‌های مختلف مقایسه گردید. در فولیکول‌های گروه NVNA و NVA این نسبت کمتر از یک می‌باشد که نشان‌دهنده بیان بیشتر Bcl-2 به عنوان سرکوب‌گر آپوپتوز نسبت به Bax به عنوان یک آغازگر آپوپتوز است. در فولیکول‌های گروه VNA و VA این نسبت بیشتر از یک بود اما در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت.



نمودار ۲) بیان نیمه کمی Bcl-2 و Bax در فولیکول‌های پره‌آنترال بزرگ در روز پنجم کشت در چهار گروه NVNA، NVA، VNA، VA  
a: اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌ها ( $p=0/001$ )



استرس‌هایی بر روی سلول‌ها شود. این استرس‌ها می‌تواند شامل استرس اسموزی به‌علت آبگیری، سمیت ضد یخ و همچنین صدمه به غشا سلول باشد. انجماد می‌تواند از طریق افزایش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا سلول شده و به سلول آسیب برساند (۱۹). اسیدآسکوربیک آنتی‌اکسیدانی است که در مایع فولیکولی وجود دارد بنابراین می‌تواند نقش فیزیولوژیکی در تکوین تخمک و جنین داشته باشد. اسیدآسکوربیک محلول در آب و یک احیاکننده‌ی خوب و برداشت‌کننده مؤثر رادیکال‌های آزاد می‌باشد. رادیکال‌های آزاد در طول ایسکمی بافت تولید شده و می‌توانند سبب آپوپتوز شوند. اهمیت اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها در کشت سلول‌ها به منظور کاهش صدماتی که به‌طور طبیعی به علت تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن<sup>۸</sup> حاصل از فعالیت متابولیکی نرمال سلولی تولید می‌شود بررسی شده است. رادیکال‌های آزاد، مسئول پراکسیداسیون لیپیدی اسیدهای چرب غیراشباع غشا سلولی هستند که منجر به صدمه و مرگ سلولی می‌شوند و آنتی‌اکسیدان‌ها به منظور کاهش این تغییرات آسیب‌رسان استفاده شده‌اند (۲۰).

نتایج تحقیق نشان داد اضافه کردن اسیدآسکوربیک به محیط کشت فولیکول‌های گروه انجمادی سبب افزایش معنی‌دار در قطر فولیکولی‌ها در روز چهارم کشت نسبت به گروه انجمادی و بدون اسیدآسکوربیک شد. از طرف دیگر از آنجاکه بین قطر فولیکول‌های گروه‌های غیرانجمادی با گروه انجمادی با اسیدآسکوربیک تفاوتی مشاهده نشد می‌توان گفت اضافه کردن اسیدآسکوربیک به محیط کشت توانسته

است کاهش قطر فولیکول‌ها را در گروه انجمادی جبران نماید. در گروه‌های غیرانجمادی اضافه کردن اسیدآسکوربیک تأثیر معنی‌داری بر روی قطر فولیکولی نداشت. بیشترین میزان بقا در روز پنجم و دهم کشت مربوط به گروه NVA و کمترین میزان بقا مربوط به گروه VNA بود. اگرچه تفاوت میزان بقا در گروه‌های انجمادی و غیرانجمادی، با و بدون اسیدآسکوربیک معنی‌دار نبود اما یافته‌ها نشان‌دهنده این است که میزان بقا فولیکول‌ها در گروه انجمادی کمتر از گروه غیرانجمادی است و اضافه کردن اسیدآسکوربیک به محیط کشت می‌تواند سبب افزایش میزان بقا فولیکول‌ها شود.

انجماد شیشه‌ای نوعی روش انجمادی است که سلول‌ها در غلظت بالای ضد یخ و سرعت زیاد منجمد می‌شوند و در نتیجه مرحله تشکیل کریستال یخ روی نمی‌دهد و صدمات وارد شده به بافت به حداقل می‌رسد (۲۱). کشت و بلوغ فولیکول‌های تخمدانی یکی از راه‌های برگرداندن قدرت باروری بعد از انجماد و ذوب تخمدان است. در طول کشت *in vitro* سلول‌ها تحت غلظت بالاتر  $O_2$  نسبت به *in vivo* حفظ می‌شوند و رادیکال‌های آزاد در سلول‌های هوازی به‌طور ممتد تولید می‌شوند. سطوح بالای رادیکال‌های آزاد سبب صدمه به سلول و از دست دادن عملکرد آن می‌شود (۲۱). در شرایط *in vivo* سلول‌ها به‌وسیله سیستم‌های دفاعی و یا آنتی‌اکسیدان‌ها محافظت می‌شوند (۱۱ و ۲۲). در طول کشت و بلوغ فولیکول‌ها، تکوین فولیکولی ممکن است به‌وسیله رادیکال‌های آزاد تحت تأثیر قرار گیرد و به همین علت محققین اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها را به محیط کشت بررسی کرده‌اند (۲۳ و ۲۴).

در مطالعه حاضر مشاهده شد که mRNA آنتی‌ژن

<sup>۸</sup> Reactive Oxygen Species (ROS)

Bcl-2 در تمام گروه‌های مورد بررسی بیان می‌شود و تفاوت معنی‌داری در سطح بیان این ژن مشاهده نشد. در مورد Bax مشاهده شد که بیان آن به‌طور معنی‌دار در فولیکول‌های گروه غیرانجمادی و حاوی اسیدآسکوربیک کمتر از گروه‌های دیگر بود. از آنجاکه بیان این دو ژن در هر دو گروه انجمادی (با و بدون اسیدآسکوربیک) با گروه غیرانجمادی و بدون اسیدآسکوربیک تفاوت معنی‌داری نداشت، شاید بتوان گفت انجماد شیشه‌ای بیان mRNA آنتی‌ژن Bcl-2 و Bax را تغییر نداده بود. اما با توجه به اینکه آنتی‌ژن Bax در فولیکول‌های گروه غیرانجمادی و حاوی اسیدآسکوربیک کمتر از سایر گروه‌ها بود، می‌توان احتمال داد که اضافه کردن اسیدآسکوربیک بیان ژن Bax را که یک ژن آغازگر آپوپتوز است کاهش می‌دهد.

با توجه به اینکه مسیرهای آپوپتوز در سلول از طریق تعادل در بیان انواع مختلف ژن‌ها به‌خصوص Bax و Bcl-2 تنظیم می‌گردد، مقایسه نسبت بیان Bax و Bcl-2 می‌تواند الگوی آپوپتوزی را در این سلول‌ها مشخص نماید. سطح Bcl-2 در این مطالعه در گروه‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری نداشت اما کاهش بیان Bax به عنوان یک پروتئین سرکوب‌گر آپوپتوز در گروه غیرانجمادی با اسیدآسکوربیک نسبت به سایر گروه‌ها می‌تواند بیانگر این احتمالی باشد که مسیرهای آپوپتوز در این گروه‌ها غیرفعال شده است. بر همین اساس در این پژوهش نسبت بیان نیمه کمی Bax به Bcl-2 در گروه‌های مختلف مقایسه گردید. این مقایسه نشان داد که اگر چه این نسبت در گروه‌های غیرانجمادی کمتر از یک و در گروه‌های انجمادی بیشتر از یک می‌باشد اما تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهند. هوسین (Hussein) و همکاران به

ارزیابی اثر زمان ایسکمی بر روی بیان پروتئین‌های Bcl-2 و p53 در بافت تخمدان انجمادی و غیرانجمادی خوک پرداختند. در پایان تحقیق، آنها اعلام کردند که آپوپتوز در آترزی فولیکولی نقش دارد؛ انجماد اثر کمی بر روی بیان پروتئین‌های Bcl-2 و p53 دارد و این سیگنال‌های آپوپتوزی را تغییر نمی‌دهد (۱۶).

کیتاگوا (Kitagawa) و همکاران اثر غلظت اکسیژن و آنتی‌اکسیدان‌ها را بر تکوین *in vitro* جنین خوک بررسی کردند و گزارش نمودند که غلظت اکسیژن پایین (۵ درصد) و آنتی‌اکسیدان‌هایی چون ویتامین E و  $\beta$  مرکاپتواتانول سطح  $H_2O_2$  را کاهش می‌دهد و تکوین جنین را بهبود داده و قطعه‌قطعه شدن DNA را کاهش می‌دهد (۱۰). پائولوپز (Paula-Lopes) و همکاران نشان دادند که سلنیوم و ویتامین E در گاو‌ها سبب بهبود باروری و شیردهی می‌شوند و این سیستم آنتی‌اکسیدانی از طریق گلوکوتاتیون پراکسیداز که وابسته به سلنیوم است صورت می‌گیرد (۲۵).

کیم (Kim) و همکاران صدمات ایسکمی را در بافت قشری تخمدان تازه و انجمادی با و بدون آنتی‌اکسیدان اسیدآسکوربیک با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در طول ۴۸ ساعت کشت بررسی کردند. با افزایش زمان کشت میزان آپوپتوز فولیکول‌های بدوی در تخمدان تازه و انجمادی افزایش نشان داد و اسیدآسکوربیک با غلظت بکاررفته نتوانست سبب بهبود میزان بقا فولیکول‌ها در هر دو گروه تازه و انجمادی شود (۱۴). در تحقیق حاضر از غلظت بیشتر اسیدآسکوربیک (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد. به‌علاوه به جای کشت قطعات بافتی تخمدان، فولیکول‌های جداشده از تخمدان کشت داده شدند. نتایج نشان داد که غلظت بیشتر اسیدآسکوربیک می‌تواند میزان بقا و رشد فولیکول‌های کشت داده شده از

پرواکسیداسیون عمل کنند. برای مثال آلفا توکوفرول در یک دوره زمانی کوتاه به عنوان آنتی اکسیدان عمل می کند؛ ولی به سرعت با گونه های اکسیژن واکنش داده و رادیکال های آزاد را تشکیل می دهد (۲۸). به همین علت غلظت آنتی اکسیدان و زمان اضافه کردن آن به محیط کشت می تواند مهم باشد.

بر اساس نتایج این تحقیق غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اسیدآسکوربیک در فولیکول های جدا شده از تخمدان غیرانجمادی تأثیری بر روی رشد، بقا و تشکیل حفره آنتروم در شرایط *in vitro* نداشت اما در گروه انجمادی در کاهش اثرات منفی انجماد شیشه ای تخمدان بر روی میزان رشد فولیکولی در *in vitro* مؤثر بود. از آنجاکه هدف نهایی کشت فولیکول ها، بدست آوردن تخمک های رسیده است بررسی نقش اسیدآسکوربیک در کیفیت تخمک در شرایط *in vitro* به خصوص پس از انجماد تخمدان لازم بنظر می رسد. همچنین در این تحقیق بیان نیمه کمی ژن های Bcl-2 و Bax در سطح mRNA بررسی شد. با توجه به اینکه عملکرد این ژن ها وقتی مشخص می شود که پروتئین آنها تغییر یابد، بررسی و مقایسه پروتئین های مرتبط با آپوپتوز فولیکولی در گروه های مورد بررسی پیشنهاد می شود.

تخمدان انجماد شیشه ای و غیرانجمادی را بهبود بخشید. مارتینز (Martins) و همکاران اثر محیط کشت  $\alpha$ -MEM تکمیل شده با آب نارگیل را بر روی شکل و فعالیت فولیکول های بدوی بز بررسی کردند. آب نارگیل حاوی اسیدآسکوربیک است که احتمالاً می تواند در بهبود شرایط کشت مؤثر باشد. بر اساس نتایج تحقیق آنها فولیکول های بدوی بز در محیط کشت  $\alpha$ -MEM توانست در شرایط *in vitro* رشد کند و اضافه کردن آب نارگیل با غلظت ۵ یا ۱۰ درصد نتوانست سبب بهبود زنده ماندن و یا رشد فولیکولی شود (۲۶).

لیماورد (Lima-Verde) و همکاران اثر آنتی اکسیدان های آلفا توکوفرول و ترناتین را بر روی مورفولوژی و فعالیت فولیکول های پره آنترال بز در کشت *in vitro* بررسی کردند. اضافه کردن غلظت های تست شده این آنتی اکسیدان ها (۵، ۱۰ و ۱۸) نتوانست سبب بهبود شرایط کشت شود (۲۷). شاید اختلاف بین نتایج تحقیقات مختلف به علت نوع و غلظت آنتی اکسیدان بکار رفته و همچنین ماده ای که به عنوان حلال آنتی اکسیدان بکار می رود باشد. همچنین گونه های مختلف و روش بکار رفته می توانند سبب این اختلاف شوند. آنتی اکسیدان ها ممکن است در غلظت بالا بعد از یک دوره خاص به عنوان

## References:

1. Smitz JE, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. Reproduction 2002; 123: 185-202.
2. Newton H, Illingworth P. In-vitro growth of the murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. Hum Reprod 2001; 16: 423-9.
3. Mazoochi T, Salehnia M, Pourbeiranvand Sh, et al. Analysis of apoptosis and expression of genes related to apoptosis in cultures of follicles derived from vitrified and non-vitrified ovaries. Mol Hum Reprod 2009; 15: 155-64.
4. Haidari K, Salehnia M, Rezazaheh Valoujerdi M. The effects of different concentration of leukemia inhibitory factor on the development of isolated preantral follicle from fresh and vitrified mouse ovaries. Iran Biomed J 2006; 10: 185-90.
5. Picton HM, Harris SE, Muruvi W, et al. The in vitro growth and maturation of follicles. Reproduction 2008; 136: 703-15.
6. Bishonga C, Takahashi Y, Katagiri S, et al. In vitro growth of mouse ovarian preantral follicles and the capacity of their oocytes to develop to blastocyst stage. J Vet Med Sci 2001; 63: 619-24.
7. Demeestere I, Delbaere A, Gervy C, et al.

- Effect of preantral follicle isolation technique on in-vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. *Hum Reprod* 2002; 17: 2152-9.
8. Cortvriendt R, Smits J, Van Steirteghem AC. In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod* 1996; 11: 2656-66.
  9. Sugino N. Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reprod Mol Biol* 2005; 4: 31-44.
  10. Kitagawa Y, Suzukib K, Yonedaa A, et al. Effect of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 2004; 62: 1186-97.
  11. Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA. The effect of different concentrations of sodium selenite on the in vitro maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25: 483-8.
  12. Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, et al. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. *Reproduction* 2001; 121: 89-96.
  13. Thomas FH, Leask R, Srsen V, et al. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction* 2001; 122: 487-95.
  14. Kim SS, Yang HW, kang HG, et al. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril* 2004; 82: 679-85.
  15. Choi D, Hwang S, Lee E, et al. Expression of mitochondria dependent apoptosis genes (p53, Bax, Bcl-2) in rat granulosa cells during follicular development. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11: 311-7.
  16. Hussein MR, Bedaiwy MA, Falcone T. Analysis of apoptotic cell death, Bcl-2, and p53 protein expression in freshly fixed and cryopreserved ovarian tissue after exposure to warm ischemia. *Fertil Steril* 2006; 85: 1082-92.
  17. Greenfeld CR, Pepling ME, Babus JK, et al. Bax regulates follicular endowment in mice. *Reproduction* 2007; 133: 865-76.
  18. Mazoochi T, Salehnia M, Valojerdi MR, et al. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* 2008; 90: 1480-6.
  19. Lane M, Maybach JM, Gardner DK. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. *Hum Reprod* 2002; 17: 2686-93.
  20. Tao Y, Zhou B, Xia G, et al. Exposure to L-ascorbic acid or  $\alpha$ -tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase I to metaphase II and prevents cumulus cells from fragmentation. *Reprod Domest Anim* 2004; 39: 52-7.
  21. Chwa M, Atilano SR, Reddy V, et al. Exposure to L-ascorbic acid and apoptosis in human keratoconus fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1902-10.
  22. Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, et al. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of woman undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod* 2003; 18: 2270-4.
  23. Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K, et al. Enhancement of development competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside during in vitro maturation. *Biol Reprod* 2001; 65: 1800-6.
  24. Jancar N, Kopitar AN, Ihan A, et al. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 91-7.
  25. Paula-Lopes FF, Al-katanani YM, Majewski AC, et al. Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows of heat-shocked Embryol. *J Dairy Sci* 2003; 86: 2343-51.
  26. Martin FS, Van den Hurk R, Santos RR, et al. Development of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. *Anim Reprod* 2005; 2: 106-13.
  27. Lima-Verde LB, Matos MHT, Bruno JB, et al. Effect of  $\alpha$ -tocopherol and ternatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles in vitro cultured. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009; 61: 57-65.
  28. Sen CK, Khanna S, Roy S. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. *Life Sci* 2006; 78: 2088-98.